

**ERYTHROBLASTENPROLIFERATION
BEI PERIODISCHER
RETIKULOZYTENAUSCHÜTTUNG**

Horst Wagner

1976

Aus dem Institut für Hämatologie der G S F

Assotiation mit EURATOM, München

(Komm. Leiter: Prof. Dr. St. Thierfelder)

ERYTHROBLASTENPROLIFERATION

BEI PERIODISCHER

RETIKULOZYTENAUSCHÜTTUNG

Inagural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Horst Wagner

aus München

München 1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Dörmer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Marx

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.10.1976



I N H A L T S Ü B E R S I C H T

A. Einführung

Feedback - Regelsystem in der Erythropoese

B. Material und Methode

I. Tiere und Zeitwahl für die Untersuchungen

II. Durchführung des autoradiographischen Versuchsteils

III. Auswertung der Präparate

IV. Berechnung der proliferationskinetischen Parameter

C. Ergebnisse

D. Diskussion

- Periodik der Retikulozytenausschüttung
- Proliferationskinetik in Abhängigkeit der rhythmischen Stimulierung
- Erklärungsversuch der eigenen Ergebnisse

E. Zusammenfassung

F. Literatur

A. EINFÜHRUNG

Oszillatorische Vorgänge sind in der Biologie allenthalben bekannt. Die einzelnen Rhythmen zeigen sehr unterschiedliche Frequenzen: Mikrorhythmen (200/sec bis 4/h), Makrorhythmen (1/sec bis 1/woche) und langfristige Rhythmen (1/Woche bis Jahre) (32,97,105). Rhythmen mit längerer Periodendauer (Makro- und langfristige Rhythmen) werden als Ausdruck eines biologischen Regelmechanismus aufgefaßt.

In der Erythropoese sind zahlreiche Untersuchungen über diesen Regelmechanismus durchgeführt worden, die Erythropoetin (ESF) als Regulans zu Grunde legen. Bisher hat keine Untersuchung experimentell klären können, wie der angenommene Regelmechanismus auf zellulärer Ebene abläuft. All diese Arbeiten basieren auf der Annahme eines Feedback- (Rückkoppelungs-) Mechanismus als wesentliches Element im Regelkreis. Im Falle der Erythropoese bedeutet der Regelkreis, daß dem Organismus durch eine ausreichende Hämoglobinkonzentration eine optimale Sauerstoffversorgung gewährleistet wird. Diese Konzentration (Istwert) wird durch einen Fühler kontrolliert; man nimmt an, daß hierzu die O_2 -Spannung in Nierenzellen maßgebend ist, die bei Unterschreiten des Sollwertes ESF freisetzen (1,49,51,55). ESF, das vermutlich erst im peripheren Blut aktiviert wird (54,66), führt zu einer Stimulierung des erythropoetischen Knochenmarks. Hierdurch kommt es solange zu einem vermehrten Ausstoß von Retikulozyten, den Hämoglobinträgern, bis der Sollwert erreicht ist, und der Stimulus abgeschaltet ist. Jedem derartigen regulatorischen System wohnt eine gewisse Trägheit inne. Wenn der Regler nach Erreichen des Sollwertes den Stimulus abschaltet, hat durch die verzöger-

ten Reaktionen bereits eine gewisse Überproduktion stattgefunden. Hiernach vergeht wieder eine Zeit, bis der Istwert unter den Sollwert absinkt, und der Stimulus von neuem aktiviert wird. Solche sich abwechselnden An- und Abschaltprozesse des Reglers führen dann zur oszillierenden Retikulozytenausschüttung im Rahmen der Erythropoese, wie es von zahlreichen Autoren beschrieben worden ist (44,67,68,86). Für die Regulation der Erythropoese wird angenommen, daß ESF spezifisch zu einer Stimulierung an der erythropoetisch determinierten Stammzelle führt (99,107), die dadurch verstärkt in Richtung erkennbarer erythropoetischer Zellen differenziert, verbunden mit einer gesteigerten Proliferation.

Zur weiteren Klärung des Regelvorganges schien es wichtig, durch die neuartige Untersuchungstechnik für die Bestimmung der Proliferationsgeschwindigkeit und DNS-Synthesegeschwindigkeit mittels ^{14}C -Autoradiographie nachzuprüfen, welche zellkinetischen Korrelate bei diesen rhythmischen Vorgängen im Bereich der erythropoetischen Vorläuferzellen ablaufen, von denen bis jetzt nur der periodische Ausstoß von Retikulozyten ins periphere Blut experimentell belegt worden ist (86,89).

Es sind zwar eine Reihe von Untersuchungen über die Wirkung von ESF-Präparationen auf die erythropoetischen Zellen durchgeführt worden, doch müssen alle diese Untersuchungen als nicht vollkommen physiologisch angesehen werden, denn bisher ist es nicht gelungen, reines Erythropoetin zu isolieren (2,4,23,52,78). Die hier durchgeführten Untersuchungen können, da kein exogener ESF-Stimulus beteiligt ist, den ersten experimentellen Beitrag zur tatsächlich physiologischen ESF-Wirkung liefern, vorausgesetzt, daß es sich bei den betrachteten oszillatorischen Vorgängen wirklich um ESF-gesteuerte Abläufe handelt.

B. MATERIAL UND METHODE

I. Tiere und Zeitwahl für die Untersuchungen.

Als Versuchstiere dienten für alle Untersuchungen männliche Mäuse vom Stamm NMRI. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten, um eine gegenseitige Beeinflussung zu unterbinden. Alle Mäuse erhielten Futter und Wasser ad libidum und alle zwei Tage frische Käfige. Die Tierstalltemperatur war Tag und Nacht gleichbleibend $25^{+1}_{-1}^{\circ}\text{C}$ bei ausreichender Luftfeuchtigkeit und Lüfterneuerung. Die Hell-Dunkel-Phasen im Tag-Nacht-Rhythmus wurden nicht künstlich beeinflusst.

Zur Bestimmung der Retikulozytenzahlen im zeitlichen Ablauf wurden 3 Gruppen von je 9 Tieren mit 14 - 16 g, 20 - 25 g und 25 - 30 g Körperanfangsgewicht verwandt und über 90, 56 und 34 Tage verfolgt. Hierzu wurde jeweils ein durch Anritzen des Schwanzendes der Maus gewonnener knapp Metallstechnadelkopf-großer Blutstropfen in zwei Tropfen Rinderserum verdünnt, dieses dann mit Brillantkresylblau gefärbt und ausgestrichen. Die Blutentnahme wurde jeden zweiten Tag um 19 Uhr vorgenommen und dauerte pro Maus bis zu 15 Sekunden. Je Präparat wurde pro 2000 - 4000 rote Blutkörperchen der Promilleanteil der Retikulozyten ermittelt. Die Blutentnahme zur Retikulozytenbestimmung wurde somit am Ende einer niedrigen, noch ziemlich gleichbleibenden Phase der circadianen Periodik der Retikulozytenausschüttung ins periphere Blut durchgeführt, die Clark und Korst (19) bei Ratten und Mäusen untersuchten. Beim normalen Menschen als Tagwesen fällt in den gleichen Teitabschnitt das Ende einer circadianen Retikulozytose (80).

Der Hauptteil der Versuche richtete sich auf die Prüfung der Zellkinetik, besonders der erythropoetischen Zellen, in Abhängigkeit von den verschiedenen Phasen der periodischen Schwankungen der relativen Retikulozytenmenge im peripheren Blut. Hierzu wurde einem größeren Kollektiv für die Retikulozytenbestimmung wie beschrieben alle zwei Tage etwas Blut entnommen. Einige Tiere wurden getötet, als der Anstieg ihrer Retikulozytenzahlen im peripheren Blut über mindestens 5 Tage den Beginn einer oszillatorischen Schwingung vermuten ließ. Ein weiterer Teil der Tiere wurde getötet, wenn deren Retikulozytenwelle den Höhepunkt bereits 3 bis 5 Tage überschritten hatte und sich etwa auf der Hälfte des abfallenden Schenkels befand. Der dritte Teil der Tiere schließlich wurde zu einem Zeitpunkt für die autoradiographischen Untersuchungen verwandt, in dem für die augenblickliche Änderung der Retikulozytenmenge gegenüber den Vortagen keine oszillatorische Schwankung zu erkennen war. Auf diese Weise entstanden drei Versuchsgruppen, im Folgenden als ansteigende Gruppe (4 Tiere), abfallende (3 Tiere) und gleichbleibende Gruppe (4 Tiere) bezeichnet.

Eine genauere Bestimmung der Schwingungsphase in der oszillierenden Retikulozytenkurve als augenblicklich ansteigende, abfallende oder gleichbleibende Phase ist für die untersuchten Tiere nicht möglich, denn die Phasen können nur aus dem vorangegangenen Kurvenverhalten hergeleitet werden. Für den abfallenden Schenkel einer Schwingung kann man die momentane Phasenlage noch am exaktesten abschätzen, wenn man vergleichend das niedrigere Retikulozytenniveau einer bereits durchlaufenen gleichbleibenden Phase hinzuzieht. Bei den anderen Phasen besteht die Schwierigkeit, daß durch Tötung des Tieres der weitere Phasenverlauf nicht mehr zu beobachten ist. Wie aus den einzelnen Retikulozytenkurven zu ersehen ist, kann die

Phase von einer Blutentnahme zur nächsten plötzlich gewechselt worden sein. Für die ansteigende Phase ist noch zu berücksichtigen, daß die Amplituden der Retikulozyten-peaks auch innerhalb der einzelnen Tiere ungleich ausfallen. Bei den Tieren, die der ansteigenden Phase zugeschrieben sind, ist es durchaus möglich, daß sie gerade am Wendepunkt zur nächsten Phase untersucht worden sind. Zu welchem Zeitpunkt in der gleichbleibenden Phase die betreffenden Mäuse getötet worden sind, ist weniger wichtig, da eine nachhinkende Wirkung des ESF-Stimulus nach mindestens 8 Tagen weitgehend unverändert niedriger relativer Retikulozytenzahl im peripheren Blut nicht mehr anzunehmen war. Ob während dieser nicht oszillierenden Phase eine unauffällige kurze Schwingung der relativen Retikulozytenzahl zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere eine neue ESF-stimulierte Retikulozytenwelle einleitet, ist nicht beurteilbar. In der Literatur ist, soweit bekannt, nicht beschrieben, ob sich eine kurze periphere Retikulozytenschwankung, die über einen direkten ESF-Stimulus durch beschleunigte Reifung und Ausschüttung der Knochenmarksretikulozyten ausgelöst wird, mit derjenigen Retikulozytenwelle überlappt, die mit einer Phasenverschiebung von 2 Tagen nach ESF-Stimulusbeginn erscheint. Diese Zeitdauer der Phasenverschiebung entspricht der Reifungszeit im Erythron für die durch ESF-Stimulus vermehrt ins Erythron differenzierenden Stammzellen.

Als radioaktive Substanzen in Form radioaktiv markierter DNS-Vorläufer dienten ^3H -Thymidin (-TdR) (in Lösung von 2×10^{-5} Mol/l; spezifische Aktivität: 5 mCi/Mol) zur Feststellung der Markierungsindices und ^{14}C -TdR (in Lösung von 2×10^{-3} Mol/l; spezifische Aktivität: 57 mCi/mMol) zur Bestimmung der DNS-Synthesegeschwindigkeit der einzelnen Zellen.

II. Versuchsdurchführung und Herstellung der Knochenmarksausstriche für die Autoradiographie.

Die Gewinnung der Knochenmarkszellen und die Inkubation wurden zu einem Zeitpunkt durchgeführt, der einen Einfluß circadianer Schwankungen auf die Ergebnisse der Proliferationskinetik nicht erwarten ließ. Dörmer et al. (42) fanden bei der Maus für den Markierungsindex des proliferativen Kompartimentes der Erythropoese ein gleichbleibendes Niveau in der Zeit von 8 - 20^h. Die Mitosen dagegen zeigen in dieser Zeit ihr tägliches Maximum (18, 19, 103), sie wurden aber hier nicht weiter beobachtet.

Das jeweils zur Präparation fällige Tier, ausgewählt nach dem Verlauf seiner Retikulozytenkurve, wurde zwischen 9 und 10 Uhr vormittags mittels Äther pro narcosi (Hoechst) getötet. Aus beiden Tibiae, Femora und Humeri, sauber aus der Maus herausgelöst und an beiden Gelenkenden gekappt, wurden die Knochenmarkszellen mit 10 ml gekühlter TC-Medium-199-Lösung mit einer Spritze (Nadelgröße 12) herausgespült und in einem Reagenzglas aufgefangen. Diese Zellsuspension wurde 10 Minuten lang bei 1000 U/min zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde resuspendiert mit 3,5 ml einer Lösung aus TC-Medium 199 mit 5×10^{-6} Mol/l Fluor-desoxyuridin (5-F-UdR) und 10^{-5} Mol/l Desoxycytidin (CdR) (10,40) und durch ein Glasfilter mit der Porengröße von 45 - 90 μ filtriert unter leichtem Sog einer Wasserstrahlpumpe. Dadurch wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Einzelheiten zur biochemischen Grundlage dieses Vorgehens finden sich bei Brinkmann und Dörmer (10). Je 0,95 ml der Zellsuspension wurden in offene mit a, b und c gekennzeichnete Reagenzröhrchen gegeben und gemäß dem nachstehenden Schema unter Zugabe der Aktivitäten im Schüttelwasserbad bei einer Schüttelfrequenz von 150

pro Minute und 37° C Wassertemperatur inkubiert:

Röhr- chen	ins Wasser- bad hinein- stellen	Zugabe		aus dem Wasserbad ins Eis
		^3H -TdR	^{14}C -TdR	
c	1'	7'		21'
b	2'		8'	15'
a	3'		9'	12'

Von den angegebenen ^{14}C -TdR bzw. ^3H -TdR Lösungen wurden jeweils 0,05 ml zugegeben, sodaß folgende Endkonzentrationen vorlagen: ^{14}C -TdR: 10^{-5} Mol/l; ^3H -TdR: 10^{-7} Mol/l. Nach 10 minütiger Zentrifugation der Suspensionen a, b und c bei -4° C mit 2000 U pro Minute wurde der Überstand verworfen, und das Zellsediment in jedem Röhrchen mit einem Tropfen Rinderserum resuspendiert. Mit Hilfe eines dünnen feinhaarigen Pinsels wurden pro Röhrchen 18 määnderförmige Ausstriche angefertigt. Nach Antrocknen der Zellen am Objektträger wurden sie in absolutem Methanol 48 Stunden fixiert und nachfolgend in Aqua dest. gespült.

Von der Tötung bis zum Inkubationsende wurden 65 Minuten nicht überschritten; daher ist eine experimentell beeinflusste DNS-Synthesegeschwindigkeit der einzelnen Zellen nicht zu befürchten, die ohne Vorinkubation mit 5-F-UdR 80 Minuten und bei optimaler Vorinkubation mit 5-F-UdR über 2 Stunden praktisch konstant bleibt (10).

Für die Autoradiographie wurde jedes a- und b-Präparat mit einem autoradiographischen Standardplättchen aus Polymethylmetacrylat (5 x 5 x 1 mm; 1,092 $\mu\text{Ci}/\text{cm}^3$) versehen (35,39). Alle autoradiographischen Präparate wurden mit einem Strippingfilm AR 10 (Kodak) überzogen. In der Filmschicht können die radioaktiven Strahlen des ^3H - bzw. ^{14}C -markierten TdR Silberkörner bilden. Dadurch werden

diejenigen Zellkerne gekennzeichnet, die genügend markierte TdR inkorporiert haben. Die Expositionsdauer betrug bei den ^3H -markierten Präparaten 5 Tage und bei den ^{14}C -Präparaten je nach ausreichender Silberkornbildung 14 bis 30 Tage. Anschließend wurden die Präparate entwickelt und gehärtet (10,39). Die radioaktiven Standards wurden wieder entfernt, die Präparate mit einer Giemsa-Lösung gefärbt und mit einem gekühlten Gemisch aus 30% Äthanol und 70% Phosphatpuffer (pH = 6,4) differenziert, um die in der Auflichtphotometrie als sogenannten Background störende Filmfärbung (35) und Überfärbung der Zellen zu beseitigen; die Zellen, insbesondere die erythropoetischen, bleiben dabei lange gut gefärbt und erkennbar; hierzu ist die mikroskopische Kontrolle der Präparate während des Entfärbens nötig.

III. Auswertung der Präparate.

Morphologie:

Die erythropoetischen Knochenmarkszellen wurden entsprechend ihrem Reifegrad unterteilt (6,8,34,100):

- Proliferative Kompartimente:

Proerythroblasten

Basophile Erythroblasten

Polychromatische Erythroblasten

- nicht proliferationsfähiges Kompartiment:

Oxyphile Erythroblasten (reifste Stufe).

Die morphologische Unterteilung der Erythroblasten wurde nach Form und Größe von Kern und Zytoplasma sowie Kernstruktur und Zytoplasmafärbung getroffen (6,8,24,100).

Folgende Parameter wurden aus der Untersuchung, Zählung und Messung der Knochenmarkszellen gewonnen:

- a) Der Anteil der kernhaltigen erythropoetischen Knochenmarkszellen auf 1000 kernhaltige Knochenmarkszellen;
- b) die relative Häufigkeit an Zellen in den erythropoetischen Zellkompartimenten;
- c) der Markierungsindex (LI) in den einzelnen proliferativen Erythroblastenkompartimenten;
- d) der Prozentsatz markierter eosinophiler myeloischer Zellen, bezogen auf die Gesamtzahl kernhaltiger Knochenmarkszellen;
- e) die DNS-Synthesegeschwindigkeit in den einzelnen proliferativen erythropoetischen Kompartimenten und im Kompartiment der eosinophilen Myelozyten.

Für die Untersuchung mußte eine Bezugspopulation hinzugezogen werden, von der man annehmen konnte, daß sie nicht dem gleichen Regelkreis unterläge wie die Erythropoese. Unter anderem ging es darum, festzustellen, ob sich die einzelnen erythropoetischen Zellkompartimente in ihren absoluten Größen ändern. Die absolute Zahl der Knochenmarkszellen konnte in diesen Versuchen nicht bestimmt werden. Die zum Vergleich hinzugezogene Untersuchung der eosinophilen myeloischen Zellen ermöglicht aber ersatzweise einen Rückschluß auf die absolute Größe der Kompartimente.

Der Markierungsindex, aus den ^3H -Präparaten ermittelt, drückt den prozentualen Anteil der DNS-synthetisierenden (TdR inkorporierenden) Zellen jedes proliferativen Kompartimentes aus. Der Vorzug der ^3H -Präparate gegenüber den ^{14}C -Präparaten liegt hierfür in der deutlicheren und besser abgegrenzten Schwärzung des Filmes über den ^3H -TdR inkorporierenden Zellkernen.

Theoretische Einführung in die Bestimmung der DNS-Synthesegeschwindigkeit und -Synthesedauer:

Durch den Nachweis der kompletten Blockierung der Thymidylat-de-novo-Synthese in der Zelle mittels 5-F-UdR war es möglich, mit ^{14}C -markiertem exogenen TdR in genügender Konzentration die DNS-Synthesegeschwindigkeit zu messen (10). Es zeigte sich, daß die inkorporierte ^{14}C -TdR-Menge während der 3. bis 7. Minute der Inkubation geradlinig zunimmt. In dieser konstanten Phase läßt sich dann aus der inkorporierten TdR-Menge die Geschwindigkeit der DNS-Synthese berechnen. Da das molare Verhältnis der Basen in der DNS des diploiden Kerns Adenin : Thymin : Guanin : Cytosin = 28,6 : 28,4 : 21,4 : 20,4 (Ratte) (16) bekannt ist, und der diploide DNS-Gehalt der Mäusezelle nach den Tonkelaar (31) $6,0 \times 10^{-12}\text{g}$ (UV-Mikrophotometrie) beträgt, läßt sich daraus die Thyminmenge im diploiden Kern mit $5230 \times 10^{-15}\text{Mol}$ bestimmen (38). Die DNS-Synthesedauer ist nun derjenigen Zeit gleichzusetzen, die für die Reduplikation der gesamten DNS-Thyminmenge aus dem exogenen TdR-Pool bei der gemessenen Einbaugeschwindigkeit benötigt wird.

Photometrische Auswertung:

Es wurde eine quantitative Messung der über den einzelnen ^{14}C -markierten Zellkernen gebildeten Silberkörnern durchgeführt. Aus den Einzelmessungen ergeben sich die Mittelwerte und Streubreiten für die verschiedenen Zellkompartimente. Von jedem Versuchstier wurden pro a- und b- Präparat (3- und 7 - Minuten-Inkubation) jeweils die Silberkörnchen über den Kernen von mindestens 50 Proerythroblasten, 50 basophilen Erythroblasten und 150 polychromatischen Erythroblasten sowie von mindestens 50 eosinophilen Myelozyten gemessen. Dabei wurden auf Gerätewohl nur Zellen ausgewählt mit mehr als 3 bis 4 Bahnschlägen über dem Kern, abhängig von Kerngröße und

Filmschleier. Für den Meßvorgang mußten die betreffenden Zellkerne jeweils in das ins Mikroskop eingespiegelte Meßblendenfeld zentriert werden. Die variierbare Meßblendenfläche wurde immer so groß gewählt, daß der darin liegende Zellkern noch von einem schmalen Zytoplasmasaum umrandet war, und somit die Kernfläche etwas kleiner als das zugehörige Meßblendenfeld war. Aus der gemessenen Intensität des von den Silberkörnern über einem Kern reflektierten Auflichtes konnte die Gesamtzahl der Silberkörner des Kerns berechnet werden. Dazu mußte man die jeweilige Meßblendenfläche photometrisch ermitteln. Empirisch erarbeitete Funktionen der Strahlengeometrie für ^{14}C und der nicht-linearen Lichtreflexion der Silberkörner wurden hier zu Hilfe genommen. Da immer etwas Zytoplasma bei den gewählten Meßblenden zum Kern mitgemessen wurde, also die Strahlenquelle nicht scharf eingeblendet wurde, trat ein Fehler auf, der von Dörmer und Brinkmann (39) auf 5 bis 8% bestimmt wurde.

Die Messungen wurden mit einem Leitz Mikroskopphotometer MPV 2 durchgeführt. Dabei wurde derjenige Anteil des auf 432 nm Wellenlänge gefilterten Auflichtes einer Quecksilberdampf Lampe gemessen, der an den Silberkörnern reflektiert wurde und auf eine Photokathode gefallen war. Mit Hilfe eines Reflexionsstandards (externer Standard) wurde die Apparatur in zeitlichen Abständen immer wieder auf denselben Wert geeicht. Die Silberkorndichte über den einzelnen Zellen wurde mit der Silberkorndichte der ^{14}C -Polymethylmetacrylatplättchen (interner Standard) verglichen, deren Radioaktivität bekannt war. Über diesen Vergleich war es möglich, die Radioaktivität der einzelnen Zelle zu berechnen; hieraus ergab sich mit Hilfe der bekannten spezifischen Aktivität des verwendeten ^{14}C -TdR die pro Einzelzelle eingebaute TdR-

Menge. Die genaue Durchführung und die Zusammenhänge der einzelnen Meßfaktoren sind von Dörmer und Mitarbeiter genauestens beschrieben worden (34,35,36,37,39,88).

IV. Berechnung der proliferationskinetischen Parameter.

Die photometrisch erfaßten und auf Lochstreifen ausgedruckten Werte sind mittels Computer „digital pdp 8/e“ der Firma „digital equipment corporation“ verarbeitet worden. Das Computerprogramm baut auf dem System Fortram IV auf. Eine schematische Aufzeichnung darüber mit den wichtigsten Parametern findet man in der Arbeit von Dörmer (36).

Für die Berechnung der DNS-Synthesedauer sind folgende wichtige Rechenschritte durchzuführen:

- a) Zunächst werden aus den eingegebenen Daten die ^{14}C -TdR-Einbauraten der einzelnen Zelle (Mol/Zelle) und die Mittelwerte des jeweiligen Kompartimentes (arithmetisches, geometrisches, harmonisches und wichtungsfreies Mittel) bestimmt.
- b) Aus den geometrischen Mittelwerten der 3- und 7-Minuten Inkubation eines Versuches (A bzw. B) läßt sich dann eine virtuelle Inkubationsdauer t_x errechnen:

$$t_x = \frac{4 B}{B - A} \text{ (min)}. \text{ Diese virtuelle Inkubationsdauer}$$

gibt diejenige Zeit an, in der die eingebaute Menge an ^{14}C -TdR bei linearer Inkorporationsgeschwindigkeit in den 7-Minuten Präparaten eingebaut worden wäre. Daraus ergibt sich die ^{14}C -TdR-Einbaurate pro Minute für die verschiedenen Zellarten der 7-Minuten Inkubation (10,34)

Eine Gegenwichtung ist bei dieser Berechnung wegen der ungleichen Häufigkeitsverteilung der verschiedenen ^{14}C -TdR-Einbauraten pro Zelle notwendig. Es ist zu berücksichtigen, daß durch die differierenden Einbauraten pro Zeit, das heißt unterschiedlich langen Syntheseseiten, die schneller DNS-synthetisierenden Zellen relativ seltener angetroffen werden als ihr Anteil reell beträgt, da sie die Synthesephase schneller durchlaufen als die langsameren Zellen, die auf Grund ihres längeren Verweilens in der S-Phase eine größere Wahrscheinlichkeit haben, angetroffen zu werden. Die Mittelwerte sind also durch eine Wichtung beeinflusst. Die Anzahl der Zellen N_s , die sich in der S-Phase befinden, stehen zur Synthesegeschwindigkeit V_s und der Synthesedauer t_s in folgender Beziehung:

$$N_s \sim \frac{1}{V_s} ; \quad N_s \sim t_s .$$

Die wichtungsfreie DNS-Synthesegeschwindigkeit lautet dann:

$$V_s = \frac{\sum v_i \cdot n_i \cdot v_i}{\sum n_i \cdot v_i} = \frac{\sum v_i^2}{\sum v_i} \quad \text{und für die}$$

wichtungsfreie DNS-Synthesezeit:

$$t_s = \frac{\sum t_i \cdot n_i \cdot t_i}{\sum n_i \cdot \frac{1}{t_i}} = \frac{n}{\sum \frac{1}{t_i}}$$

n_i : ist die Gesamtzahl aller Zellen eines Kompartimentes,

i : bezieht sich auf die einzelne Zelle,

v_i : bezeichnet die zu jeder einzelnen Zelle gehörige DNS-Synthesegeschwindigkeit,

t_i : bedeutet DNS-Synthesedauer jeder individuellen Zelle.

Aus den obig gewonnenen Daten kann man für ein Kompartiment, in dem sich alle Zellen am Zellzyklus beteiligen, die Zellzyklusdauer t_c berechnen:

$$t_c = N_c \cdot \frac{t_s}{N_s} = \frac{1}{LI} \cdot t_s ;$$

N_c : relative Zellzahl eines Kompartimentes pro 1000 Knochenmarkszellen,

N_s : relative Zahl der DNS-synthetisierenden Zellen von N_c ,

t_s : DNS-Synthesedauer (Stunden),

LI: Markierungsindex.

Die relative Produktionsrate P jedes Kompartimentes ergibt sich als:

$$P = \frac{N_s}{t_s} .$$

Die relative Produktionsrate ist unabhängig von der Wachstumsfraktion eines Kompartimentes.

Fehlergröße bei der Bestimmung des ^{14}C -TdR-Einbaus:

Photometrie- und Geometriekorrektur für die Silberkornzahlberechnung ergeben einen Fehler von 3%. Schwankende Untergrundwerte verursachen einen weiteren Fehler von 3%. Hinzu kommt noch ein Fehler von ca 5% durch eine größer als die Kernfläche gewählte Meßblendenfläche. Im Zusammenhang mit den ^{14}C -Standards entstehen weitere 10% Fehler. Bei der verwendeten Silberkorndichte resultiert nach dem Gesetz des radioaktiven Zerfalls ein Variationskoeffizient von rund 13%. Aus den einzelnen Fehlern bei der Bestimmung der DNS-Synthesedauer läßt sich nach dem Gesetz der additiven Fehlerfortpflanzung für die Einzelzelle ein Gesamtfehler von 17% errechnen; dieser entspricht der Standardabweichung des Einzelwertes. Da für jeden Versuchsteil mindestens je 50 Pro- und basophile Erythroblasten ausgewertet worden sind, hat sich der Fehler des Mittelwertes für diese Kompartimente auf 2,4% verringert, und ist für das polychromatische Erythroblastenkompartiment (mindestens 150 Zellen) unter 1,7% gesunken. (33,34,39).

C. ERGEBNISSE

In den über 34, 56 und 90 Tagen verfolgten Retikulozytenkurven zeigt sich die Tendenz einer abnehmenden durchschnittlichen Retikulozytenzahl mit zunehmendem Alter.

Die Erwartung einer rhythmischen Retikulozytenausschüttung ins periphere Blut wurde weitgehend erfüllt. Soweit aus den Kurven zu erkennen ist, besteht eine Zyklusdauer, die zwischen 14 und 32 Tagen schwankt. Bei 10 Tieren sind ausgeprägte Schwankungen mit Maximaabstand von 28 bis 32 Tagen und bei 4 Tieren auch von 14 bis 16 Tagen zu sehen. Bei weiteren 10 Tieren lassen sich nur gering ausgeprägte Schwankungen feststellen, aus denen noch eine Rhythmik vermutet werden darf. Vereinzelte Tiere zeigen keinerlei derartige verwertbare Schwankungen, die Rückschlüsse auf eine Periodik zulassen. Beispiele für die unterschiedlichen Oszillationstypen sind in Abb. 1 gezeigt. Abb. 2 enthält die Retikulozytenmittelwertskurve einer Gruppe von 9 Tieren, verfolgt von der 1. bis zur 13. Woche.

Bei der Untersuchung der Häufigkeiten der Zellen in den einzelnen Kompartimenten (Abb. 3) fällt auf, daß die frühen erythropoetischen Vorstufen (Pro- und basophile Erythroblasten) eine erhöhte Zellzahl während der ansteigenden Phase der Retikulozytenkurve aufweisen. In der abfallenden Phase liegen die Zellzahlen dieser Kompartimente sogar noch unter den schon niedrigen Werten derjenigen Tiere, die gerade keine Oszillation zeigen. Von den späten erythropoetischen Vorstufen (polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten) sind jeweils in der ansteigenden und abfallenden Phase eines Retikulozytenpeaks wesentlich höhere Zellzahlen in den Kompartimenten zu finden als in einer Phase ohne Retikulozytenpeak.

Im Vergleich dazu zeigt die eosinophile myeloische Reihe nur geringe Schwankungen, dergestalt, daß leicht erhöhte Werte in der abfallenden Phase der Retikulozytenkurve gefunden worden sind. In Anbetracht der geringen Tierzahl und der Streuung von Tier zu Tier darf man diesen Befund jedoch nicht weiter interpretieren. Analog zu den Verhältnissen der Gesamtzellzahl in den einzelnen Kompartimenten verhält sich auch die relative Zahl markierter Zellen.

Abb. 5 zeigt, daß phasenabhängig mäßigere, bis 20 % reichende Unterschiede im Markierungsindex gefunden wurden. Die basophilen Erythroblasten zeigen die höchsten Markierungsindices in allen drei Phasen. Die eosinophilen Myelozyten weisen wiederum keine phasenabhängigen Unterschiede auf. Hierbei muß berücksichtigt werden, daß der Markierungsindex der eosinophilen Zellen nicht auf das rein proliferative Kompartiment berechnet wurde, das morphologisch nicht sicher abgrenzbar ist, sondern hier die Zahl der markierten myeloischen eosinophilen Zellen auf die Gesamtzahl der eosinophilen Reihe bezogen ist.

Für alle drei erkennbaren proliferierenden Erythroblastenkompartimente zeigt sich ein deutlicher Unterschied der Mittelwerte weiterer Parameter zwischen ansteigender und gleichbleibender Retikulozytenphase (Abb. 6 - 8). Im Falle der DNS-Synthesedauer sind die Werte im ansteigenden Teil deutlich kürzer (Abb. 6). Im einzelnen ergaben sich folgende Unterschiede zwischen ansteigender und gleichbleibender Phase:

Proerythroblasten:	29% ($p < 0,1$)
basophile Erythroblasten:	53% ($p < 0,1$)
polychromatische Erythroblasten:	35% ($p > 0,1$)

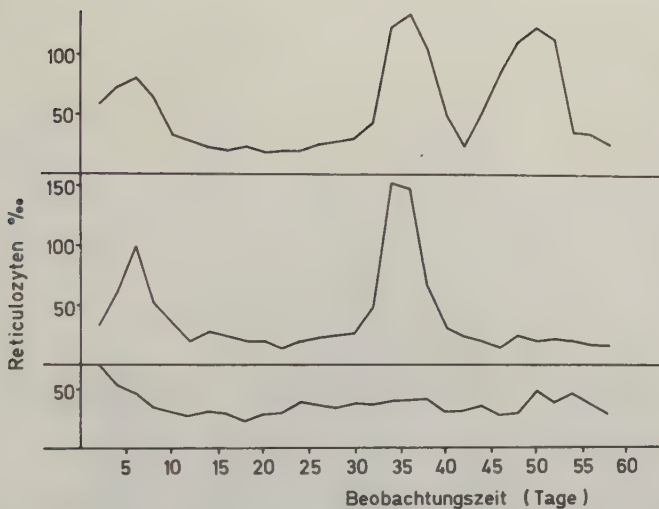


Abb. 1: Retikulozytenkurven von 3 Einzeltieren: 2 Tiere mit ausgeprägter Schwingung, 1 Tier mit sehr schwacher, kaum erkennbarer Schwingung.

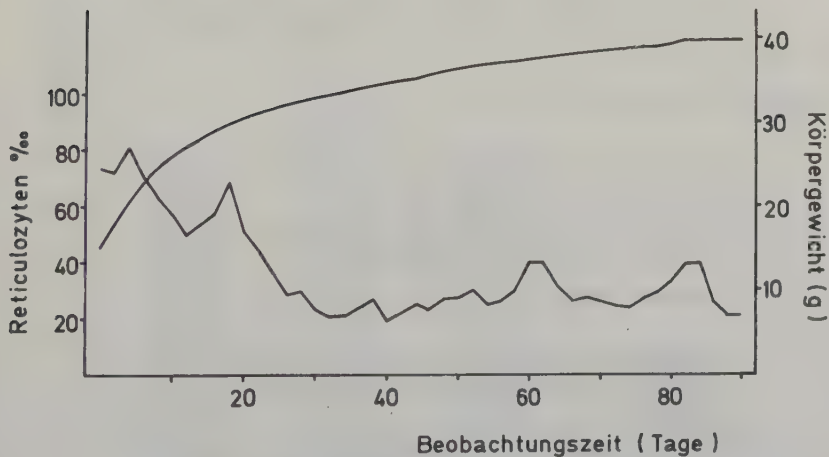


Abb. 2: Retikulozytengesamtkurve von 9 Tieren mit anfänglichem Körpergewicht von ca 14 g.

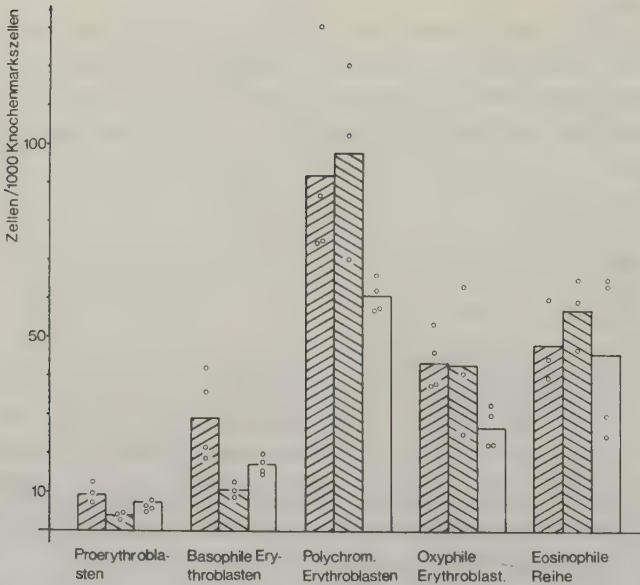


Abb. 3: Relative Größe der einzelnen Erythroblastenkompartimente und der eosinophilen Reihe bezogen auf 1000 kernhaltige Knochenmarkszellen während der drei Phasen der Retikulozytenschwingung.

Zeichenerklärung für Abb. 3 - 8:

Die proliferationskinetischen Parameter der Knochenmarkszellen wurden gemessen:

- während des ansteigenden Schenkels einer Retikulozytenschwingung:



- während des abfallenden Schenkels:



- während einer gleichbleibenden Phase ohne oszillatorischen Retikulozytenpeak:



Die Höhe jeder Säule beschreibt jeweils den Mittelwert aus den mit o gekennzeichneten Einzelwerten.

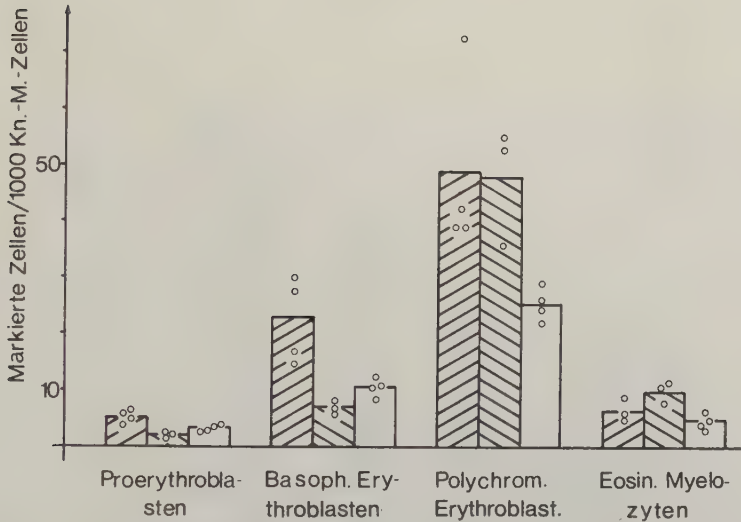


Abb. 4: Relative Zahl markierter Zellen der proliferativen Erythroblastenkompartimente und der eosinophilen Myelozyten pro 1000 kernhaltige Knochenmarkszellen während der ansteigenden, abfallenden und gleichbleibenden Phase der oszillatorischen Retikulozytenschwingung.

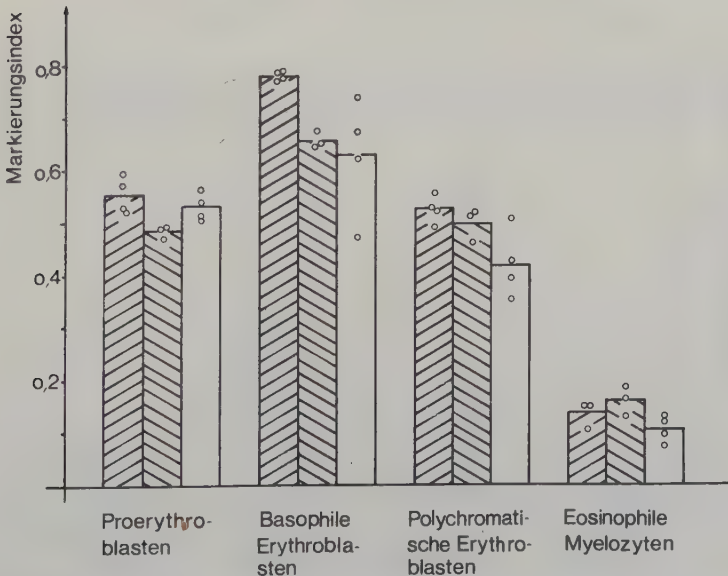


Abb. 5: Markierungsindex der proliferativen Erythroblastenkompimente und der eosinophilen Reihe in den einzelnen Schwingungsphasen der Retikulozytenkurve.

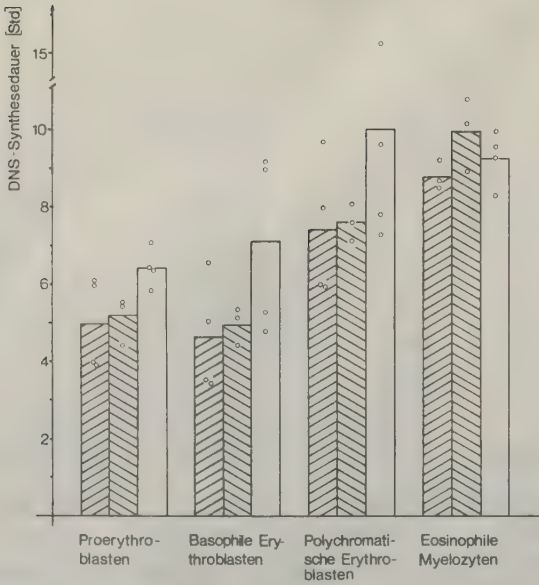


Abb. 6: Dauer der DNS-Synthesephase (Stunden) der proliferierenden Erythroblasten und eosinophilen Myelozyten in den verschiedenen Retikulozytenphasen.

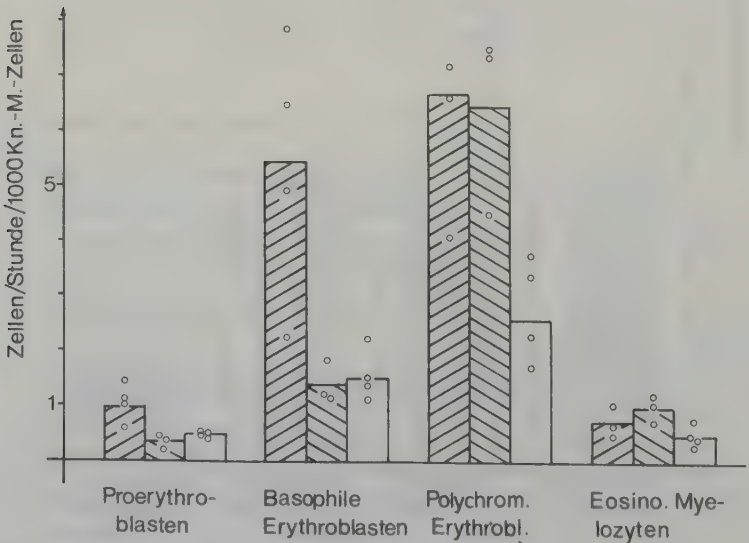


Abb. 7: Relative Produktionsrate (Zellen pro Stunde pro 1000 kernhaltige Knochenmarkszellen) der proliferativen Erythroblastenkompimente und der eosinophilen Myelozyten.

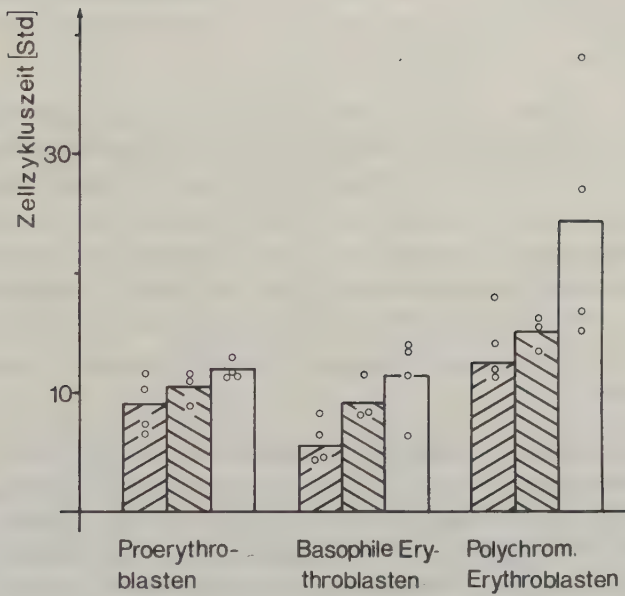


Abb. 8: Zellzykluszeit t_c der Zellen in den proliferierenden Erythroblastenkompartmenten während der drei Phasen der periodischen Retikulozytenschwingungen.

Trotz der großen Unterschiede der Mittelwerte liegt wegen der geringen Tierzahl und der hohen Streuung keine zufriedenstellende Signifikanz vor.

Bei analogem Vergleich der relativen Produktionsraten (Abb.7) im ansteigenden gegenüber dem gleichbleibenden Teil der Retikulozytenkurve ergab sich eine Steigerung um:

Proerythroblasten:	2,8 fach ($p < 0,02$)
basophile Erythroblasten:	3,6 fach ($p < 0,02$)
polychromatische Erythroblasten:	2,65 fach ($p < 0,02$)

Damit liegt für diesen Parameter eine zufriedenstellende Signifikanz vor.

Während die Unterschiede zwischen ansteigender und gleichbleibender Phase für alle drei proliferationsfähigen Erythroblastenkompartimente vorhanden sind, besteht zwischen ansteigender und abfallender Phase nur im Bereich der Pro- und basophilen Erythroblasten ein deutlicher Unterschied: im Anteil der Zellen pro 1000 Knochenmarkszellen, im Markierungsindex und in der Produktionsrate. Die DNS-Synthesedauer ändert sich für alle drei Kompartimente nicht zwischen ansteigender und abfallender Phase, ist jedoch dann in der gleichbleibenden Phase länger.

Bei der Zellzykluszeit t_c (Abb. 8) finden sich für Pro- und basophile Erythroblasten in allen drei Phasen nur geringe Unterschiede (ansteigende < abfallende < gleichbleibende Phase); bei den polychromatischen Erythroblasten zeigen diejenigen in der gleichbleibenden Phase eine etwas deutlicher verlängerte Zellzykluszeit.

Für das gesamte proliferative erythropoetische Kompartiment ergibt sich als Produktionsrate in der ansteigen-

den Phase ein Wert von 13,2, in der abfallenden von 8,2 und in der gleichbleibenden Phase ein Wert von 4,9 Zellen pro Stunde pro 1000 Knochenmarkszellen.

Zum Vergleich zur erythropoetischen Reihe wurden die einzelnen Parameter der eosinophilen Myelozyten herangezogen: Weder für den Markierungsindex, die relative Häufigkeit, die DNS-Synthesedauer und die Generationszeit, noch für die relative Produktionsrate ließen sich Unterschiede finden, die zeitlich mit den Retikulozytenschwankungen im peripheren Blut korrelieren.

D. DISKUSSION

Periodik der Retikulozytenausschüttung ins periphere Blut.

Die Periodendauer der Retikulozytenausschüttung ist hier nicht als konstant zu bezeichnen. Zwar erscheint in der Retikulozytengesamtkurve fast regelmäßig ein 14 bis 28 Tage dauernder Rhythmus, doch zeigen nicht alle Tiere diese Periodik. Bei einigen Tieren ist sie länger als 28 Tage. Zwei Tiere weisen sogar nach einer 28-Tage-Schwingung 14 Tage später eine ebenso ausgeprägte Nachschwankung auf (Abb. 1). Diese Ergebnisse ähneln denjenigen von Morley (86) bei Hunden gewonnenen Werten, welche in zwei Gruppen zusammengefaßt regelmäßige Rhythmen in der Retikulozytenausschüttung von 14 bis 23 Tagen und 21 bis 35 Tagen Dauer aufwiesen. Zusätzlich ist zu beachten, daß die Tiere mit gleichem Ausgangsgewicht nicht synchron schwingen, das heißt, zu jedem Zeitpunkt nicht gemeinsam die gleichen Phasenmomente aufweisen, sondern gegeneinander teilweise um mehrere Tage verschoben sind.

Crosby (25) stellte beim Menschen mit hereditärer hämolytischer Anämie eine Zyklusdauer von 21 bis 28 Tagen fest, die über die fäkale Urobilinogenausscheidung als Ausdruck jeweils vermehrten Zerfalls von Erythrozyten gemessen wurde. Bei der zyklischen Neutropenie des Menschen zeichnet sich für die oszillierenden peripheren Blutkörperchenzahlen (Granulozyten und Erythrozyten) eine Periodendauer von 20 bis 21 Tagen ab (9). Meuret und Fliedner (84) schreiben dagegen in einem Fall menschlicher zyklischer Neutropenie von gleichbleibender Erythrozytenzahl bei ca 26 Tage dauernder Periodik der gegenphasig schwingenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Die gleiche Krankheit weist beim Kaninchen

eine Periodendauer von 8 bis 13 Tagen auf (27,65) und beim Grey Collie Dog 12 Tage (91).

Aus dem Verlauf der Retikulozytenkurve der meisten Tiere entsteht der Eindruck, daß die durchschnittlich pro Tag produzierte relative Retikulozytenmenge mit zunehmendem Alter absinkt. Diese Erscheinung ähnelt den Untersuchungsergebnissen von Miller und Osmond (85) und tritt besonders im ersten Lebensabschnitt der Tiere in Erscheinung. Möglicherweise läßt sich hier ein erhöhter STH-Stimulus auf die Erythropoese im Rahmen einer noch beschleunigten Wachstumsphase verifizieren (94), wobei STH nicht die Retikulozytenreifung und -ausschüttung beeinflusst (45). Eine sehr deutliche Abnahme der Retikulozytenzahl ($^{\circ}/_{oo}$) mit zunehmendem Körpergewicht und daher auch mit zunehmendem Alter wurde von Ganzoni in genaueren Untersuchungen über die Erythropoese festgestellt (51). Hierfür wurden Ratten von ca 50 g Geburtsgewicht bis 400 g Körpergewicht, was einem Lebensalter der Tiere von 140 Tagen entspricht, fortlaufend untersucht. Absolutmessungen über die tägliche Erythrozytenproduktion pro Gramm Körpergewicht ergaben den gleichen Kurvenverlauf im selben Lebensabschnitt.

In der eigenen Arbeit wurden keine absoluten Zellzahlen pro Tier bestimmt, sondern nur relative Zahlenbezüge auf 1000 rote Blutkörperchen bei den Retikulozyten bzw. auf 1000 kernhaltige Knochenmarkszellen bei den erythropoetischen und eosinophilen myeloischen Zellreihen. Im Falle der Retikulozyten ist die Bestimmung der relativen Häufigkeit ausreichend, da bei der Gesamterythrozytenmasse, auf welche die Retikulozyten bezogen sind, sicher anzunehmen ist, daß keine größeren prozentualen Schwankungen innerhalb kurzer Zeitabschnitte erfolgen. Bezüglich der kernhaltigen Knochenmarkszellen wäre eine absolute Bestimmung der Zahlen erythropoetischer kernhaltiger Vorstufen erwün-

schenswert gewesen. Dies war jedoch technisch unmöglich, da ein nicht geringer Teil des Knochenmarkes aus den Extremitäten für die sofortige Inkubation mit ^{14}C -TdR benötigt wurde, und damit für Absolutmessungen, beispielsweise ^{59}Fe -Markierung (43), nicht mehr genügend zur Verfügung stand. Ersatzweise ist deshalb die eosinophile Reihe ausgezählt worden, von der eingangs angenommen wurde, daß sie nicht dem Regelkreis unterliegt, der zu den periodischen Retikulozytenschwankungen führt. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen diese Annahme weitgehend und machen die eosinophilen Myelozyten deshalb zu einer brauchbaren Kontrollpopulation. Ein Gleichbleiben der numerischen Parameter der eosinophilen Reihe erlaubt den Rückschluß, daß die in der Erythropoese im Zusammenhang mit den Retikulozytenpeaks gefundenen Veränderungen nicht auf relative Verschiebungen der Häufigkeit von Zellen der weißen und roten Reihe zurückzuführen sind, sondern absoluten Größenänderungen entsprechen. Das Gleichbleiben der zellkinetischen Parameter in der eosinophilen Reihe deutet auf die Erythropoese-spezifischen Regelvorgänge hin im Zusammenhang mit den Retikulozytenkurven. Der weitgehend unabhängig erfolgende Ablauf des erythropoetischen Regelsystems vom granulopoetischen wurde in zahlreichen experimentellen Arbeiten bestätigt gefunden (22,26,69,85,89,101,102).

Periodische Retikulozytenausschüttung als primäre oder sekundäre Folge eines Stimulus.

Stohlman (102) stellte fest, daß ein „Population - Pressure“ für die Retikulozytenausschüttung, respektive hier Retikulozytenperiodik, keine bedeutende Rolle spielt, d. h., die im Knochenmark produzierten Retikulozyten dort nicht oder kaum kumulieren, um dann bei bestimmtem Staudruck jeweils ausgeschüttet zu werden. Die in den

eigenen Versuchen gewonnenen Ergebnisse lassen ebenfalls auf einen unwesentlichen „Population - Pressure“ schließen. Zwar bewirkt der ESF-Stimulus direkt eine schnell eintretende Retikulozytenausschüttung mit höheren Spitzenwerten, doch hält eine Veränderung wie bei den diurnalen Retikulozytenschwankungen (80,81,103) nur einige Stunden an, um dann fast Nullwerte zu erreichen (53). Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen ist anzunehmen, daß ein eventuelles Reservoir im Knochenmark bei Ausschüttung nach einem Tage erschöpft ist (60,90), und die peripher meßbare Retikulozytenschwankung schnell verstreicht (45,48,53,92). Bei unseren Ergebnissen dagegen steigt die periphere Retikulozytenzahl etwa 6 Tage lang an und nimmt über eine Zeitspanne von 6 bis 8 Tagen wieder ab. Für die mehrere Tage dauernde Retikulozytose als sekundäre Folge eines Stimulus kommt nur eine verstärkte Proliferation der erythropoetischen Vorstufen in Frage, die über den spezifischen ESF-gesteuerten Regelmechanismus oder einen entsprechend auf die Erythropoese wirkenden Reiz ausgelöst wurde.

Proliferationskinetik in Abhängigkeit von der rhythmischen Stimulierung.

Die Relation der Häufigkeit von Zellen in den einzelnen Erythroblastenkompartimenten stimmt während der ansteigenden und gleichbleibenden Phase fast überein. In der abfallenden Phase findet man noch die erhöhte Zellzahl wie in der ansteigenden Phase im Bereich der polychromatischen Erythroblasten. Da die Zellzahlen während der ansteigenden Phase insgesamt wesentlich höher liegen, als in der gleichbleibenden, könnte man diese Erscheinung als Bild einer auslaufenden oder durchlaufenden Zellproliferationswelle ansehen, die in der ansteigenden Phase das gesamte proliferative Erythron erfaßt

und in der abfallenden Phase die Kompartimente der Pro- und basophilen Erythroblasten bereits verlassen hat. In dieser abfallenden Phase wird demnach ein ungleicher Einstrom und Ausstrom von Zellen angetroffen. In der gleichbleibenden Phase findet man die geringste relative Häufigkeit erythropoetischer Zellen. Diese Untersuchungen sind dahingehend interpretierbar, daß ein Zellausstrom aus dem Stammzellbereich zuerst in das Proerythroblastenkompartiment erfolgt und dann nachfolgend das basophile Kompartiment erfaßt, was sich kurz vor oder gerade eben zu Beginn der ansteigenden Retikulozytenkurve abspielt. Eine solche Proliferationswelle ist in vielen Arbeiten mit unterschiedlich verursachter Erythroblastopenie durch ESF-Gabe ausgelöst worden (28,29,30,46,70, 74,106) und an Hand der zyklischen Neutropenie gezeigt worden (9,65).

Der Anteil DNS-synthetisierender Zellen jedes Kompartimentes (Markierungsindex LI) zeigt die gleichen Variationen von einer Phase zur anderen, wie die relativen Zellzahlen in den Kompartimenten, abgesehen von einer geringen Abweichung im basophilen Erythroblastenkompartiment. Die Werte für die ansteigende bzw. gleichbleibende Phase korrelieren mit denen der phenylhydrazin-anämisierten bzw. normalen Ratten (108); wobei aber in den eigenen Untersuchungen die basophilen Erythroblasten den höchsten Markierungsindex zeigen. Die bei Lala (74) für Mäuseerythroblasten angegebenen Markierungsindices sind über die Hälfte kleiner, als die in der eigenen Arbeit ermittelten, und gleichen fast den Markierungsindices nephrektomierter Mäuse (70). Diese Abweichung der Ergebnisse in Lala's Untersuchungen liegt möglicherweise in der andersartigen Mäuserasse. Coggle und Gordon (20) weisen darauf hin, daß die verschiedenen Mäusestämme in der Anzahl der Colony - Forming - Units (CFU) und der

kernhaltigen hämopoetischen Zellen in Knochenmark und Milz bis zum Dreifachen differieren können, dagegen im Blutvolumen sich weitgehend gleichen.

Die DNS-Synthesedauer zeigt in der gleichbleibenden Phase für alle drei proliferativen Kompartimente längere Werte als während einer Stimulation. Signifikante Unterschiede bestehen für Pro- und basophile Erythroblasten zwischen abfallender und gleichbleibender Phase ($p < 0,01$ bzw $p < 0,05$). Die prozentuale Veränderung der S-Dauer zwischen diesen beiden Phasen beträgt 20 % und zeigt das gleiche Verhältnis wie bei phenylhydrazin-anämisierten gegenüber normalen Tieren (57,108). Bei akuter hämolytischer Anämie des Menschen verglichen mit Normalpersonen ist der Unterschied etwas größer (34). Für die ansteigende wie für die abfallende Phase ist ein ESF-Reiz als ursächlich zu diskutieren, da auch bei eventuell ESF-stimulierter Erythropoese vergleichbare Relationen zu Normaltieren in der DNS-Synthesegeschwindigkeit gefunden wurden (59,90). Der absolute Wert der hier bestimmten DNS-Synthesedauer ist nur mit Werten aus wenigen Arbeiten über die Maus voll vergleichbar (59,70,77) und liegt im selben Bereich; in anderen Arbeiten wurde das undetailierte Erythron oder die DNS-Synthese- und Verdoppelungszeit der CFU betrachtet, die hier schwer vergleichbar sind (5,7,17,50,75). Die Zeiten anderer Tiere liegen im gleichen bis unteren Bereich der eigenen Untersuchungsergebnisse (11,41,57,108). Der normale Mensch hat eine länger dauernde Synthesephase (34).

Auffallend ist die Erscheinung, daß in der abfallenden Phase die Größe und der Markierungsindex der Pro- und basophilen Erythroblastenkompartimenten schon deutlich vermindert sind, während die DNS-Synthesegeschwindigkeiten für alle drei proliferativen erythropoetischen Kom-

partimente gegenüber der gleichbleibenden Phase noch beschleunigt sind. Für die Untersuchung der Knochenmarkszellen in der abfallenden Phase sind die betreffenden Tiere erst 3 bis 4 Tage nach dem Retikulozytengipfel getötet worden. Bei einer Erythronpassagezeit von 2 bis 4 Tagen (28,60,62,64) und einer anzunehmenden Funktion des Feedbackmechanismus muß man den Stop für den ESF-Stimulus bereits ca 6 Tage vor der Tötung der Tiere ansetzen. Man kann daraus auf zumindest zwei verschiedene Manifestationen eines ESF-Stimulus in der proliferativen Zellreihe schließen.

Zellzykluszeit und Produktionsrate veranschaulichen in unterschiedlichem Maße das Zusammenwirken der vorher besprochenen Parameter (Zellzahl, LI, DNS-Synthesedauer). Die Mittelwerte der Zellzykluszeiten t_c (siehe Abb. 7) der proliferierenden Kompartimente zu den drei Phasen zeigen untereinander verglichen keine signifikanten Veränderungen. Von der ansteigenden Phase über die abfallende zur gleichbleibenden Phase hin betrachtet läßt sich die Tendenz einer Zunahme der Zellzykluszeiten in allen drei erythropoetischen Kompartimenten erkennen. Die Zellzykluszeiten des polychromatischen Erythroblastenkompartimentes sind dabei am längsten. Die phasenbezogenen Werte von t_c spiegeln keinen dominierenden ESF-Stimulus im Sinne einer gesteigerten Proliferationsgeschwindigkeit der Einzelzelle wider. Sie entsprechen in der ansteigenden Phase den Ergebnissen der Normaltiere in den Versuchen von Klein et al. (70) und in der abfallenden und gleichbleibenden Phase den Zeiten, die Papayannopoulou und Finch (90) für die Zellzyklusdauer von Erythroblasten normaler Mäuse gefunden haben. Die Zellzykluszeiten für die proliferativen Rattenerythroblasten liegen ungefähr in diesem Bereich (57,108); für den Menschen sind sie etwas länger (34).

Zwischen den Phasen hoher und niedriger Produktionsleistung (Abb. 8) der erythropoetischen Kompartimente besteht ein signifikanter Unterschied. Die in der ansteigenden Phase hohe Produktionsrate ist für die Pro- und basophilen Erythroblasten bereits in der abfallenden Phase auf ein Drittel erniedrigt. Die polychromatischen Erythroblasten, die in der abfallenden Phase noch unverändert aktiviert sind, haben das niedrige Produktionsniveau erst eine Phase später, in der gleichbleibenden, erreicht.

Erklärungsversuch der eigenen Ergebnisse in Hinblick des Erythropoese - spezifischen Regelsystems.

Ein anschauliches Bild des Zusammenwirkens der Regelgrößen mit ihrer gegenseitigen und eigenen Steuerung im hämopoetischen System geben die teilweise mathematisch untermauerten Modellvorstellungen mehrerer Autoren (44, 67, 71, 73).

Für die rhythmische Erythropoese, wie sie in dieser Arbeit gezeigt worden ist, fällt den bekannten Hormonen, dem Zentralnervensystem und der Mikroumgebung, deren direkter erythropoetischer Effekt in verschiedenen Untersuchungen bewiesen worden ist (4, 12, 13, 14, 15, 21, 58, 61, 72, 79, 81, 94), wahrscheinlich keine wesentliche Schlüsselfunktion zu, da für diese Faktoren keine entsprechenden periodischen Einflüsse bei männlichen Tieren bekannt sind.

Die dominierende Steuergröße im erythropoetischen Regelkreis verkörpert mit Sicherheit das ESF. Ungeachtet des hier nebensächlichen Einflusses auf die Retikulozytenreifung wirkt ESF auf die erythropoetisch determinierte „Committed - Stem - Cell“ folgendermaßen zu-

sammengefaßt:

- in einer vermehrten Differenzierung von Stammzellen in das Erythron mit Anwachsen des Proerythroblastenkompartimentes und nachfolgend auch der reiferen Kompartimente (34,46,48,62,72,87,92,104),
- und einer beschleunigten Differenzierung und Zellteilung bei verkürzter G_1 -Phase (87) und beschleunigter DNS-Synthesegeschwindigkeit, sowie Verkürzung der Zellzykluszeit und der Transit - Time (3,21,72,90,104).

Die beiden Antworten der Stammzelle auf den ESF-Stimulus bestätigen die in unserer Arbeit gefundene erythropoetische Proliferationswelle und verkürzte DNS-Synthesedauer während des Retikulozytenpeaks als Ausdruck einer temporär durch ESF ausgelösten beschleunigten Proliferation. Das abweichende Verhalten der DNS-Synthesegeschwindigkeit in der abfallenden Phase gegenüber dem numerischen Ausdruck der Erythroblastenwelle läßt aber auf zwei verschiedene Angriffspunkte von ESF schließen:

- Beschleunigung von Stammzelldifferenzierung
- Beeinflussung von Zellzyklusparametern der reifenden Zellen.

Werden beide Stimuli von der „Committed - Stem - Cell“ aufgenommen, so bedeutet dies, daß in der abfallenden Phase die bereits sinkende ESF - Konzentration im Serum nicht mehr ausreicht, eine erhöhte Differenzierungsrate aufrechtzuerhalten, aber die zuvor stimulierten Zellen während ihrer Ausreifung die Information für eine verkürzte DNS-Synthesedauer behalten („Carry - Over“).

„Carry - Over“ bedeutet in der Erythropoese: Ein einmal in eine differenzierende Stammzelle gesetzter Stimulus wird während des Reifungsprozesses im Erythron unverändert beibehalten und von Kompartiment zu Kompartiment weitergegeben (3,21,59,95,104).

Nach den eigenen Ergebnissen ist ein solcher „Carry-Over“ unwahrscheinlich, da Umfang von Zelldifferenzierung und Verkürzung der DNS-Synthesedauer proportional bleiben müßten.

Eine Alternative für das ungleiche Verhalten der DNS-Synthesedauer und der Differenzierungsrate bietet die Annahme, daß beide Parameter durch unterschiedliche ESF-Konzentrationen beeinflusbar sind, und die Angriffspunkte nicht gemeinsam in der Stammzelle liegen. Gegenüber dem in der Stammzelle auszulösenden Stimulus für die Differenzierungsrate wird die DNS-Synthesegeschwindigkeit durch ESF in allen drei proliferativen Kompartimenten gleichzeitig stimuliert (21,56,82). In diesem Falle gilt somit während der abfallenden Phase, daß die bereits abgenommene ESF-Konzentration im Serum nur noch die DNS-Synthesegeschwindigkeit direkt zu steigern vermag. Nach dem Ende der ESF-Stimulierung verschwindet dann in allen drei Kompartimenten der DNS-Stimulus ohne „Carry - Over“ wieder gleichzeitig. Dieser Darstellung entspräche das in der eigenen Arbeit entstandene Bild vom Verhalten der DNS-Synthesedauer. Eine ähnliche Aussage über die Steuerung der DNS-Synthesegeschwindigkeit ergeben die Versuche von Hegemann (59).

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Retikulozytenausschüttung ins periphere Blut ist bei der normalen Maus periodisch und unterliegt einem biologischen Rhythmus, dessen Steuermechanismus durch Erythropoetinwirkung erklärbar ist. Die Periodendauer liegt zwischen 14 und 30 Tagen; sie wird von einigen Tieren um wenige Tage überschritten. Die temporäre Retikulozytenvermehrung über 10 bis 12 Tage steht in direktem Zusammenhang mit einer wechselnden Proliferationskinetik des erythropoetischen Knochenmarkes. Die Periodik wird wahrscheinlich durch eine veränderliche ESF-Konzentration und damit unterschiedliche Stimuluswirkung hervorgerufen. ESF stimuliert hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit eine in Richtung Erythropoese determinierte Stammzelle („Committed - Stem - Cell“) möglicherweise in zwei getrennten Funktionen:

- a) in der Differenzierungsrate, d. h. der Zahl bereitgestellter Erythroblasten;
- b) in einer gesteigerten DNS-Synthesegeschwindigkeit, die den differenzierenden Zellen mit auf den Weg gegeben wird („Carry - Over“). Möglicherweise ist diese zweite Funktion aber auch Stammzell-unabhängig und ein direkter Einfluß gewisser ESF-Konzentrationen auf differenzierende Erythroblasten.

Das Verhalten der proliferativen Parameter der erythropoetischen Knochenmarkszellen während der ansteigenden, abfallenden und gleichbleibenden Phase einer Schwingung in der Retikulozytenkurve zeigt das Bild einer ESF-stimulierten erythropoetischen Welle. Diese Proliferationswelle beginnt mit Wahrscheinlichkeit im Stammzellbereich, wandert unbeeinträchtigt durch das

Erythron und läuft in einer vorübergehenden Retikulozytose aus. Diese Aktivierung der Erythropoese durch ESF verläuft anscheinend unabhängig von der Granulopoese.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen zahlreiche Ergebnisse, in denen mit ESF-Präparationen die Erythropoese experimentell stimuliert wurde. Sie zeichnet sich gegenüber diesen Untersuchungen dadurch aus, daß eventuelle unphysiologische Begleitkomponenten bei der Stimulierung ausgeschaltet sind. Damit wird ESF als wichtigster Faktor im physiologischen Erythropoese-Regelkreis untermauert.

F. LITERATUR

- 1) ADAMSON, J.W.
Oxygen Delivery by Abnormal Hemoglobins: Effects on Erythropoietin Production.
In: Hemopoietic Cellular Proliferation, Ed.: F. Stohman jr., pp 112-121, Grune & Stratton, New York - London (1970)
- 2) ALLEN, R.C., D.J. MOORE, and J.W. FISHER
Preliminary Purification of Sheep and Mouse Erythropoietin by Vertical Flat Bed Discontinuous Electrophoresis in Acrylamid Gel.
Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol. 149, 63 - 70 (1968)
- 3) ALPEN, E.L. and L.G. LAJTHA
Lack of Direct Effect of the Erythropoietin on Human Erythroid Cells In Vitro.
Nature, 184, 1228-1229, (1959).
- 4) BACIU, J.
Die humorale und nervöse Regelung der Erythropoese.
Klinische Wochenschrift 18, 133-143, (1970).
- 5) BECKER, A.J., E.A. MCCULLOCH, L. SIMINOVITCH, and J.E. TILL
The Effect of Differing Demands for Blood Cell Production on DNA Synthesis by Hemopoietic Colony-Forming Cells of Mice.
Blood, 26, 296-308, (1965).
- 6) BEGEMANN, H., J. RASTETTER und W. KABOTH
Klinische Hämatologie, Ed.: H. Begemann
G. Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, (1975).
- 7) BLEIBERG, I., M. LIRON, and M. FELDMANN
Studies on the Regulation of Hemopoietic Spleen Colonies.
Blood, 29, 469-480, (1967).
- 8) BOLL, I.
Die Proliferationskinetik der normalen und angeregten Erythropoese nach morphologischen Kriterien.
Hämatologie und Bluttransfusion Bd 8, J.H. Lehmanns Verlag, München (1969).
- 9) BRANDT, L., O. FORSSMAN, F. MITELMAN, H. ODEBERG, T. OLOFSSON, I. OLSSON, and B. SVENSSON
Cell Production and Cell Function in Human Cyclic Neutropenia.
Scand. J. Haematol. 15, 228-240, (1975).

- 10) BRINKMANN, W. und P. DÖRMER
In-vitro-Verfahren zur Bestimmung der DNS-Synthesedauer einzelner Zellen. Biochemische Voraussetzungen und Ergebnisse.
Histochemie 30, 335-343, (1972)
- 11) BRINKMANN, W., P. DÖRMER und P. MUSCHALIK
Die Bestimmung der DNS-Synthesezeit von Knochenmarkszellen in vitro durch quantitative Autoradiographie.
Klin. Wochenschrift 47, 1327-1328, (1969).
- 12) BYRON, J.W.
Comparison of the Action of ^3H -Thymidine and Hydroxyurea on Testosterone-treated Hemopoietic Stem Cells.
Blood, 40, 198-203, (1972).
- 13) BYRON, J.W.
Effect of Steroids and Dibutryl Cyclic AMP on the Sensitivity of Haemopoietic Stem Cells to ^3H -Thymidine in vitro.
Nature, 234, 39-40, (1971).
- 14) BYRON, J.W.
Effect of Steroids on the Cycling of Haemopoietic Stem Cells.
Nature, 228, 1204, (1970)
- 15) BYRON, J.W.
Evidence for a β -adrenergic Receptor Initiating DNA Synthesis in Haemopoietic Stem Cells.
Exptl. Cell Res. 71, 228-232, (1972).
- 16) CHARGAFF, E.
Isolation and Composition of the Desoxypentose Nucleic Acids and of the Corresponding Nucleoproteins.
In: The Nucleic Acids, Vol. I, pp 307-407, Eds.: E. Chargaff and J.N. Davidson;
Acad. Press, New York, (1955).
- 17) CHERVENICK, P.A. and D.R. BOGGS
Patterns of Proliferation and Differentiation of Hematopoietic Stem Cells After Compartment Depletion.
Blood, 37, 568-580, (1971)
- 18) CLARK, R.H. and D.R. KORST
Diurnal Variation in Bone Marrow Mitoses and Reticulocytes.
Clinical Research, 13, 111, (1965).
- 19) CLARK, R.H. and D.R. KORST
Circadian Periodicity of Bone Marrow Mitotic Activity and Reticulocyte Counts in Rats and Mice.
Science, 166, 236-237, (1969)

- 20) COGGLE, J.E. and M.Y. GORDON
Quantitative Measurements on the Haemopoietic Systems
of Three Strains of Mice.
Exp. Hemat. 3, 181-186, (1975)
- 21) COLE, J.E. and R.G. TARBUTT
Kinetics of Cell Multiplication and Differentiation
During Adult and Prenatal Haemopoiesis.
In: Cell Cycle in Development and Differentiation;
Eds.: M. Balls and F.S. Billet, pp 365- 395,
Cambridge U. P. (1973)
- 22) CONSTABLE, T.B. and N.M. BLACKETT
The Relationship Between Granulocytic and Erythroid
Repopulating Ability.
Exp. Hemat. 2, 131-137, (1974).
- 23) CONTRERA, J.S. and A.S. GORDON
The Renal Erythropoietic Factor I:
Studies on Its Purification and Properties.
Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 149, 114-119, (1969).
- 24) COVELLI, V., G. BRIGANTI, and G. SILINI
An Analysis of Bone Marrow Erythropoiesis in the Mouse.
Cell Tissue Kinet. 5 41-51, (1972)
- 25) CROSBY, W.H.
The Limits of Erythropoiesis: How Much Can the Marrow
Produce with Recruitment?
Blood Cells 1, 497-507, (1975).
- 26) CURRY, J.L., J.TRENTIN, and N. WOLF
Hemopoietic Spleen Colony Studies.
J. Exp. Med 125, 703-719, (1967)
- 27) DALE, D.C., D.W. ALLING, and S.W. WOLF
Cyclic Hematopoiesis: the Mechanism of the Cyclic
Neutropenia in Grey Collie Dogs.
J. Clin. Invest. 51, 2197 ff, (1972)
- 28) DEGOWIN, R.L.
Erythroid Differentiation During Stem Cell Prolife-
ration.
J. Lab. & Clin. Med. 70, 23-35, (1967).
- 29) DEGOWIN, R.L., J.C.HOAK, and S.H. MILLER
Relationship of Early Proliferating Cells to Erythro-
blasts in Hemopoietic Colonies.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 631-635, (1972)
- 30) DEGOWIN, R.L., J.C. HOAK, and S.H. MILLER
Erythroblastic Differentiation of Stem Cells in Hemo-
poietic Clonies. Blood, 40, 881-892, (1972)

- 31) DEN TONKELAAR, E.M.
Photographic Colorimetry.
Acta histol. Suppl. Bd. VI, pp 97-101, (1965)
- 32) DIRSCHEL, H.
Biologische Rhythmen.
Sitzungsberichte der Sächs. Akad. der Wissenschaft zu
Leipzig, math. nat. Kl., Bd. 109, 5
Akademie Verlag, Berlin, (1972).
- 33) DÖRMER, P.
Photometric Methods in Quantitative Autoradiography.
In: Microautoradiography and Electron Probe Analysis,
Ed.: U. Lüttge, pp 7-48, Springer, Berlin Heidelberg
New York, (1972).
- 34) DÖRMER, P.
Kinetics of Erythropoietic Cell Proliferation in
Normal and Anemic Man. A New Approach Using Quantita-
tive ^{14}C -Autoradiography.
Progress in Histochemistry and Cytochemistry, Vol.
6, 1; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, (1973).
- 35) DÖRMER, P.
Quantitative Autoradiography at Cellular Level.
In: Micromethods in Molecular Biology, Ed.: V. Neu-
hoff, Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics
Vol. 14, pp 347-393, Springer, Berlin-Heidelberg- N.Y.
(1973)
- 36) DÖRMER, P.
Auflicht-Hellfeld-Photometrie in der quantitativen
Autoradiographie: Entwicklung zur Automatisierung.
Leitz Mitteilungen für Wiss. u. Technik, Bd. VI, 3,
81-90, (1974).
- 37) DÖRMER, P. und W. BRINKMANN
Auflichtphotometrie von Mikroautoradiogrammen für
quantitative Einbaustudien an Einzelzellen.
Z. Anal. Chem. 252, 84-89, (1970).
- 38) DÖRMER, P. und W. BRINKMANN
Estimations of the DNA Synthesis Rate of Bone Marrow
Cells after Administration of Labelled Thymidine In
Vitro.
In: In Vitro Procedures With Radioisotopes in Medi-
cine, pp 59-70, International Atomic Energy Agency,
Vienna (1970).
- 39) DÖRMER, P. und W. BRINKMANN
Quantitative ^{14}C -Autoradiographie einzelner Zellen.
Histochemie 29, 248-269, (1972)

- 40) DÖRMER, P., W. BRINKMANN und P. DAHR jr.
Thymidylat-de-novo-Synthese, salvage pathway und DNS-Synthese während der Differenzierung von Erythroblasten. Blut, XXV, 185-189, (1972).
- 41) DÖRMER, P., W. BRINKMANN, W. BORN und G.G. STEEL
Rate and Time of DNA Synthesis of Individual Chinese Hamster Cells.
Cell Tissue Kinet. 8, 339-412, (1975).
- 42) DÖRMER, P., W. SCHMOLKE, P. MUSCHALIK und W. BRINKMANN
Die DNS-Synthesegeschwindigkeit im Verlaufe der DNS-Synthesephase von Erythroblasten der Maus in vivo.
Beitr. Path. Bd 141, 174-186, (1970).
- 43) DONOHUE, D.M., B.W. GABRIO, C.A. FINCH
Quantitative Measurement of Hemopoietic Cells of the Marrow.
J. Clin. Invest. 37, 1564-1570, (1958).
- 44) DÜCHTING, W.
Computersimulationen von Zellerneuerungssystemen.
Blut, 31, 371-388, (1975).
- 45) ENGELBRECHT, H.M. und W. REMMELE
Der Einfluß von Erythropoietin und somatotropem Hormon auf die Retikulozyten-Reifungszeit in vitro.
Blut, XIX, 385-393, (1969).
- 46) ERSLEV, A.J.
The Role of Erythropoietin in the Control of Red Cell Production.
Medicine 43, 661-665, (1964).
- 47) FILMANOWICZ, E. and C.W. GURNEY
Studies on Erythropoiesis. XVI: Response to a Single Dose of Erythropoietin in Polycythemic Mouse.
J. Lab. Clin. Med. 57, 65-72, (1961)
- 48) FISCHER, S.
Studies on the Mechanism and Site of Action of Erythropoietin. In Erythropoiesis, Eds.: L.O. Jacobson and M. Doyle, pp 204-215, Grune & Stratton, N. Y. (1962)
- 49) FISHER, J.W. and J.W. LANGSTON
Effects of Testosterone, Cobalt and Hypoxia on Erythropoietin Production in the Isolated Perfused Dog Kidney.
Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 149, 75-87, (1968)
- 50) FRINDEL, E., M. TUBIANA, F. VASSORT
Generation Cycle of Mouse Bone Marrow.
Nature, 214, 1017-1018, (1967).

- 51) GANZONI, A.M.
Kinetik und Regulation der Erythrozytenproduktion.
Experimentelle Medizin, Pathologie und Klinik,
Bd. 31, (1970).
- 52) GOLDWASSER, E. and C.K.H. KUNG
Progress in the Purification of Erythropoietin.
Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 149, 49-53, (1968).
- 53) GORDON, A.S., LOBUE J., B.S. DORNFEST, and G.W. COOPER
Reticulocyte and Leukocyte Release from Isolated Per-
fused Rat Legs and Femurs.
In: Erythropoiesis, Eds.: L.O.Jacobson and M. Doyle,
Grune & Stratton, New York - London (1962), pp 321-327.
- 54) GORDON, A.S., COOPER G.W., and ZANJANI E.D.
The Kidney and Erythropoiesis
Sem. in Hemat. 4, 337-358, (1967)
- 55) GORDON, A.S., E.A. MIRAND, J. WENIG, R.KATZ, and
E.D. ZANJANI
Androgen Actions on Erythropoiesis.
Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 149, 318-335, (1968).
- 56) GROSS, M. and E. GOLDWASSER
On Mechanism of Erythropoietin-induced Differentiation
VII. The Relationship Between Stimulated Deoxyribo-
nucleic Acid Synthesis and Ribonucleic Acid Synthesis.
J. Biol. Chem. 245, 1632-1636, (1970).
- 57) HANNA, I.R.A., R.G. TAR BUTT, and L.F. LAMERTON
Shortening of the Cell-Cycle Time of Erythroid Precur-
sors in Response to Anaemia.
Brit. J. Haemat. 16, 381-387, (1969).
- 58) HARRISON, D.E.
Normal Production of Erythrocytes by Mouse Marrow
Continuous for 73 Months.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 3184-3188, (1973).
- 59) HEGEMANN, F.
Wirkung von Erythropoetin auf die DNS-Synthesege-
schwindigkeit differenzierender erythropoetischer
Knochenmarkszellen.
Dissertation, Ludw.-Max.-Universität München (1974).
- 60) HODGSON, G. and ESKUCHE I.
Dose Response Relationship for the "Early " and "Late"
Response to Erythropoietin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127, 1094-1096, (1968).

- 61) HOLLAN, S.R.
Über die neurale Regulation der Blutzellen.
Folia Haematologica (Leipzig) 80, 138-152, (1963).
- 62) ITO, K., W. SCHMAUS, and K.R. REISSMAN
Protein Metabolism and Erythropoiesis
III. The Erythroid Marrow in Protein-Starved Rats
and Its Response to Erythropoietin.
Acta haemat. 32, 257-264, (1964).
- 63) IZQUIERDO, J.N. and S.J. GIBBS
Turnover of Cell-Renewing Populations Undergoing
Circadian Rhythms in Cell Proliferation
Cell Tissue Kinet. 7, 99-111, (1974).
- 64) JACOBSON, L.O., E. GOLDWASSER, and C.W. GURNEY
Transfusion-Induced Polycythaemia as a Model for
Studying Factors Influencing Erythropoiesis.
In: *Cell Production and Its Regulation*, Eds.: G.E.W.
Wolstenholme and M.O. Conner, Ciba Foundation Sym-
position on Haemopoiesis, pp 423-446, (1960)
- 65) JONES, J.B., R.D. LANGE, T.J. YANG, H. VODOPICK,
and E.S. JONES
Canine Cyclic Neutopenia: Erythropoietin and Plate-
let Cycles After Bone Marrow Transplantation.
Blood, 45, 213-219, (1975).
- 66) KATZ, R., G.W.COOPER, A.S. GORDON, and E.D. ZANJANI
Studies on the Site of Production of Erythropoietin.
Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 149, 120-127, (1968).
- 67) KIRK, J., J.S. ORR, and C.S. HOPE
A Mathematical Analysis of Red Blood Cell and Bone
Marrow Stem Cell Control Mechanisms.
Brit. J. Haemat. 15, 35-46, (1968).
- 68) KIRK, J., T.E. WHELDON, W.M. GRAY, and J.S. ORR
Cybernetics of the Red-Blood Cell and Bone-Marrow
Stem-Cell System.
Int. J. Biomed. Comput. 1, 291-306, (1970).
- 69) KIVILAAKSO, E. and RYTÖMAA, T.
The Effect of Polycythaemic Serum on the Proliferation
of Rat Bone Marrow Cells In Vitro.
Cell Tissue Kinet. 3, 385-392, (1970).
- 70) KLEIN, H.O., K.J. LENNARTZ, M. EDER und R. GROSS
Autoradiographische und hämatologische Untersuchung
zur Zellkinetik der Erythroblasten im Kurzzeitver-
such nach doppelseitiger Nephrektomie und Ureterli-
gatur bei Mäusen.
Blut XIX, 8, 449-456, (1969)

- 71) KRETCHMAR, A.L.
Erythropoietin: Hypothesis of Action Tested by
Analog Computer.
Science 152, 367-370, (1966)
- 72) KUBANEK, B., L. FERRARI, W.S. TYLER, D. HOWARD,
S. JAY, and F. STOHLMAN, jr.
Regulation of Erythropoiesis: XXIII. Dissociation
between Stem Cell and Erythroid Response to Hypoxia.
Blood, 32, 586-596
- 73) LAJTHA, L.G., and R. SCHOFIELD
Regulation of Stem Cell Renewal and Differentiation
Possible Significance in Aging.
ADV Gerontol. Res. 3, 131-146, (1971).
- 74) LAJTHA, L.G.
Kinetics of Proliferation and Differentiation in
Haemopoiesis.
In: Regulation of Erythropoiesis, Eds.: A.S. Gordon,
M. Condorelli, and C. Peschle, pp 47-51,
The Publishing House "Il Ponte" Milano. (1972).
- 75) LALA, P.K.
DNA-Synthesis Time of Bone Marrow Cells in Healthy
and Ascites Tumor-Bearing Mice.
Cell Tissue Kinet. 5, 79-85, (1972).
- 76) LEWIS, J.P. and F.E. TROBAUGH, jr.
Haematopoietic Stem Cells.
Nature, 204, 589-590, (1964).
- 77) LORD, B.I.
Measurement of the Duration of DNA Synthesis in Ery-
throid Cells of the Bone Marrow Using a Double Label-
ling Autoradiographic Technique Designed Specifically
for Use with Haemopoietic Tissues.
Cell Tissue Kinet. 3, 13-19, (1970).
- 78) LOWY, P.H. and G. KEIGHLY
The Fractionation of Erythropoietin from Anemic and
Normal Human Urine.
Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 149, 54-62, (1968).
- 79) MCCULLOCH, E.A. and J.E. TILL
Effects of Short-Term Culture on Populations of Hemo-
poietic Progenitor Cells from Mouse Marrow.
Cell Tissue Kinet. 4, 11-20, (1971).
- 80) MCKEE, L.G., L.E. JOHNSON, and R.D. LANGE
Circadian Variation in Reticulocyte Counts and Im-
muno-detectable Erythropoietin Titers.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145, 1284-1287, (1974).

- 81) MALGOR, L.A., C.C. BLANC, E. KLAINER, S.E. IRIZAR, P.R. TORALES, and L. BARRIOS
Direct Effects of Thyroid Hormones on Bone Marrow Erythroid Cells of Rats.
Blood, 45, 671-679, (1975).
- 82) MATOTH, Y.
In Vitro Methods in the Study of Erythropoietin.
In: Erythropoiesis, Eds.: L.O. Jacobson and M. Doyle, pp 299-303, Grune & Stratton, N.Y. - London, (1962).
- 83) MAUER, A.M.
Diurnal Variation of Proliferative Activity in the Human Bone Marrow.
Blood, 26, 1-7, (1965).
- 84) MEURET, G. and T.M. FLIEDNER
Neutrophil and Monocyte Kinetics in a Case of Cyclic Neutropenia.
Blood, 43, 565-571, (1974).
- 85) MILLER, S.C. and D.G. OSMOND
Quantitative Changes with Age in Bone Marrow Cell Populations of C3H Mice.
Exp. Hemat. 2, 227-236, (1974).
- 86) MORLEY, A., E.A. KING-SMITH, and STOHLMAN F. jr.
The Oscillatory Nature of Hemopoiesis.
In: Hemopoietic Cellular Proliferation, Ed.: F. Stohlman jr., pp 3-14, Grune & Stratton, New York, (1970).
- 87) MORSE, B.S., N.J. RENCRICCA, and F. STOHLMAN jr.
The Mechanism of Action of Erythropoietin in Relationship to Cell Cycle Kinetics.
In: Hemopoietic Cellular Proliferation, Ed.: F. Stohlman jr., pp160-170, Grune & Stratton, New York, (1970).
- 88) OEHLERT, W.
Durchführung und Anwendungsmöglichkeiten der autoradiographischen Methode in der Pathologie.
Schweiz. Med. Wo.Schr. 9, 1009-1014, (1964)
- 89) ORR, J.S. J. KIRK, K.G. GRAY, and J.R. ANDERSON
A Study of the Interdependence of Red Cell and Bone Marrow Stem Cell Populations.
Brit. J. Haemat. 15, 23-34, (1968).
- 90) PAPAYANNOPOULOU, T. and C.A. FINCH
On the In Vivo Action of Erythropoietin:
A Quantitative Analysis.
J. Clin. Invest. 51, 1179-1185, (1972).

- 91) PATT, H.M., J.E. LUND, and M.A. MALONEY
Cyclic Hematopoiesis in Grey Collie Dogs: A Stem-Cell Problem.
Blood, 42, 873-884, (1973).
- 92) PAUL, J. and J.A. HUNTER
DNA Synthesis is Essential for Increased Haemoglobin Synthesis in Response to Erythropoietin.
Nature, 219, 1362-1363, (1968).
- 93) PERRETTA, M. and C. TIRAPEGUI
Effect of Erythropoietin on Nucleic Acid Metabolism from Polycythemic Rat Bone Marrow.
Experientia 24, 680-681, (1968).
- 94) PESCHLE, C., G.F. SASSO, I.A. RAPPAPORT, F. ROSSANGIO, A.S. GORDON, and M.CONDORELLI
Humoral Influences on Erythropoiesis and Erythropoietin Production.
In: Regulation of Erythropoiesis, Eds.: A.S. Gordon, M.Concorelli, and C. Peschle, pp 269-301,
The Publishing House "Il Ponte" Milano, (1972).
- 95) PINTO, B.
Effect of Erythropoietin on Red Cell Differentiation Binding of Erythropoietin to DNA.
Experientia 24, 489-491, (1968).
- 96) QUASTLER, H.
The Analysis of Cell Population Kinetics.
In: Cell Proliferation, Eds.: L.F. Lamerton and R.J.M. Fry, pp 18-36, Blackwell Scientific Publications Oxford, (1963).
- 97) RENSING, L.
Biologische Rhythmen und Regulationen.
Grundbegriffe der modernen Biologie Bd 10 (1973)
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- 98) REYNARFARJE, C.
Humoral Regulation of the Erythropoietic Depression of High Altitude Polycythemic Subjects after Return to Sea Level.
Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 149, 472-474, (1968).
- 99) RIFKIND, R.A. and P.A. MARKS
The Regulation of Erythropoiesis
Blood Cells 1, 417-428, (1975).
- 100) ROHR, K.
Das menschliche Knochenmark
G. Thieme Verlag, Stuttgart, (1960).

- 101) RYTÖMÄÄ, T.
Granulocytic Chalone and Antichalone.
Am. Tissue Culture Ass., Symposium on "Haematopoietic
Cells in Vitro", Puerto Rico (1968).
- 102) SCHOOLEY, J.C., and D.H.Y. LIN
Hematopoiesis and the Colony-Forming Unit.
In: Regulation of Erythropoiesis, Eds: A.S. Gordon,
M. Condorelli, and C. Peschle; pp 52-67,
The Publishing House "Il Ponte" Milano (1972)
- 103) SHARKIS, S.J., J.LOBUE, P. ALEXANDER jr., F. RAKO-
WITZ, A. WEITZ-HAMBURGER, and A.S. GORDON
Circadian Variations in Mouse Hematopoiesis. II. Sex
Differences in Mitotic Indices of Femoral Diaphyseal
Marrow Cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 494-496, (1971)
- 104) SILVER, R.K. and A.J. ERSLEV
The Action of Erythropoietin on Erythroid Cells in
vitro.
Scand. J. Haemat. 13, 338-351, (1974)
- 105) SOLLBERGER, A.
Biol. Rhythm Research.
Elsevier Publ. Co., Amsterdam, London, New York (1965)
- 106) STOHLMAN, F. jr.
Observations on the Changes in the Kinetics of Red
Cell Proliferation Following Irradiation and Hyper-
transfusion.
Blood, 15, 1777-1787, (1960)
- 107) STOHLMAN, F. jr., S. EBBE, B. MORSE, D. HOWARD, and
J. DONOVAN
Regulation of Erythropoiesis XX.
Kinetics of Red Cell Production.
Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol. 149, 156-172, (1968)
- 108) TAR BUTT, R.G.
Cell Population Kinetics of the Erythroid System in
the Rat. The Response to Protracted Anaemia and to
Continuous γ -Irradiation.
Brit. J. Haemat. 16, 9-24, (1969)

Mein besonderer Dank für die Unterstützung und Förderung gilt Herrn Priv. Doz. Dr. P. Dörmer, unter dessen Leitung die Arbeit entstand.

L E B E N S L A U F

Am 15. September 1944 wurde ich als Sohn des Rechtsanwaltes Dr.- Ing. Heinz Wagner und seiner Frau Gemahlin Lisa, geb. Harjes, in Dresden geboren. Die Volksschule und das Gymnasium besuchte ich in München. Nach dem Abitur 1966 leistete ich zwölf Monate Grundwehrdienst bei der Bundeswehr ab. Anschließend im Herbst 1967 studierte ich Medizin an der Universität München und arbeitete nach dem Staatsexamen im Winter 1973 als Medizinalassistent an mehreren Krankenhäusern in München. Im Mai 1975 erhielt ich die Bestallung zum Arzt. Von Mai 1975 bis April 1976 wurde meine Dissertationsarbeit durch ein Stipendium der GSF unterstützt. Seit Mai 1976 bin ich im Rahmen des SFB 51 am Hämatologischen Institut der GSF in München als wissenschaftlicher Assistent tätig.

